10.22092/sppi.2021.124605

"مجله نهال و بذر"
جلد ۳۷، شماره ۱، سال ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

غربالگری بیولوژیکی و مولکولی برخی ارقام و کلونهای امیدبخش سیب‌زمینی برای مقاومت به ویروس X سیب‌زمینی

Biological and Molecular Screening of Some Potato Cultivars and Promising Clones for Resistance to *Potato Virus* X (PVX)

رحیم احمدوند[۱]، حجت اله جوانمرد طوسی[۲]، احمد موسی پور گرجی[۳]

۱- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.
۳- دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۶ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۰۴/۰۵

چکیده

احمدوند، ر.، جوانمرد طوسی، ح. و موسی پور گرجی، ا. ۱۴۰۰. غربالگری بیولوژیکی و مولکولی برخی ارقام و کلونهای امیدبخش سیب‌زمینی برای مقاومت به ویروس X سیب‌زمینی. **مجله نهال و بذر۳۷: ۸۲-۶۳.**

این پژوهش به‌منظور غربالگری برخی ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی شامل ۳۵ رقم تجاری در ایران و ۲۴ کلون امیدبخش حاصل از برنامه‌های به نژادی، نسبت به ویروس X سیب زمینی (Potato virus X = PVX) با استفاده از آزمون‌های بیولوژیکی و نشانگرهای مولکولی انجام شد. برای این منظور، ابتدا جدایه ویروسی روی گیاه محک گل تکمه‌ای مایه‌زنی و خالص‌سازی بیولوژیک و سپس با مایه‌زنی روی گیاه توتون، تکثیر و در محیط کشت بافت نگهداری گردید. برای ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌ها نسبت به این ویروس از روش استاندارد مرکز بین‌المللی سیب‌زمینی(CIP) شامل مایه‌زنی مکانیکی و پیوند استفاده شد. ابتدا سه گیاهچه سیب‌زمینی از هر ژنوتیپ به‌صورت مکانیکی در شرایط گلخانه‌ای توسط عصاره آلوده به ویروس مایه‌زنی شد و ژنوتیپ‌ها براساس نتایج آزمون DAS-ELISA در دو گروه مقاوم و حساس قرار گرفتند. به‌منظور تعیین نوع مقاومت ژنوتیپ‌های مقاوم بر روی گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به PVX در سه تکرار پیوند و آلودگی آنها توسط آزمون الایزا بررسی شد. نتایج حاصل از هر دو آزمایش مایه‌زنی مکانیکی و پیوند نشان داد که ۱۲ رقم تجاری و ۱۱ کلون امیدبخش سیب‌زمینی دارای مقاومت از نوع بسیار بالا (Extreme Resistance, ER) و ۹ رقم تجاری و یک کلون امیدبخش دارای مقاومت از نوع فوق حساسیت (Hypersensitive Reaction, HR) نسبت به PVX بودند. سایر ژنوتیپ‌ها شامل ۱۴ رقم تجاری و ۱۲ کلون امیدبخش در حداقل یکی از تکرارها به PVX آلوده شدند و به‌عنوان حساس شناسایی گردیدند. غربالگری برای ژن‌های مقاومت *Rx1* و *Rx2* نیز توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) به‌ترتیب با استفاده از نشانگرهای اختصاصی 5RX1 و 106RX2 در ژنوتیپ‌های با مقاومت ER انجام شد. نتایج بررسی‌های مولکولی نیز نشان داد که ۱۳ ژنوتیپ سیب‌زمینی دارای ژن مقاومت *Rx1* و هفت ژنوتیپ دارای ژن مقاومت *Rx2* بودند و در ژنوتیپ‌های با مقاومت HR و حساس هیچیک از این ژن‌ها ردیابی نشد و با نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای و سرولوژیکی مطابقت داشت. با توجه به نتایج این پژوهش از ژنوتیپ‌های با مقاومت ER به ویروس و دارای ژن *Rx1* و یا *Rx2* می توان در برنامه‌های به نژادی به عنوان والد مقاوم برای تولید ارقام سیب زمینی با صفات مطلوب زراعی و مقاوم نسبت به PVX استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: سیب‌زمینی، مقاومت فوق‌حساسیت، مقاومت بسیار بالا، نشانگر مولکولی، رقم مقاوم.

نگارنده مسئول: ahmadvandra@gmail.com تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۳۷۸۵

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) نقش مهمی در تغذیه مردم جهان داشته و ارزش غذایی آن هم‌ردیف گندم و برنج است. سیب‌زمینی در ۱۴۰ کشور کشت می‌شود که بیش از ۱۰۰ کشور تولیدکننده آن در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری واقع شده‌اند. سیب‌زمینی ازنظر تولید سالیانه بعد از گندم، برنج و ذرت در جهان در مقام چهارم قرار دارد (Ezekiel *et al.*, 2013). بر اساس آمارنامه کشاورزی در سال ۹۸-۱۳۹۷ سطح زیر کشت این محصول در کشور ۱۴۳ هزار هکتار و تولیدی معادل ۵/۲ میلیون تن و میانگین عملکرد ۳۷ تن در هکتار بود (Anonymous, 2019).

یکی از موانع اصلی تولید سیب‌زمینی خسارت ناشی از آفات و بیماری‌ها می‌باشد که در برخی موارد عملکرد را تا بیش از ۹۰ درصد کاهش می‌دهند. در بین عوامل بیماری‌زای مختلف این محصول، ویروس‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند، زیرا سیب‌زمینی به صورت غیرجنسی تکثیر شده و آلودگی ویروسی به نسل‌های بعدی نیز منتقل می‌شود. تاکنون بیش از ۵۰ نوع بیماری ویروسی از سیب‌زمینی گزارش شده که تعدادی از آنها اهمیت اقتصادی داشته و در هر منطقه تعدادی از آنها خسارت بالایی به این محصول وارد می‌کنند. خسارت ناشی از بیماری‌های ویروسی به نوع ویروس و نژاد آن، رقم سیب‌زمینی، نحوه انتقال و شرایط محیطی بستگی دارد و از ۱۰ تا ۹۰ درصد گزارش شده است (de Bokx *et al.*, 1972).

ویروس X سیب‌زمینی (*Potato virus X*, PVX) دارای گسترش جهانی بوده و یکی از شایع‌ترین ویروس های سیب‌زمینی است، به‌طوری که به عنوان دهمین ویروس مهم گیاهی شناسایی شده است (Scholthof *et al.*, 2011). میزان خسارت آن به نژاد ویروس و رقم سیب‌زمینی بستگی داشته و از ۱۰ تا بیش از ۵۰ درصد گزارش شده است. این ویروس ممکن است به‌صورت نهفته بوده و به‌ظاهر هیچ‌گونه علائمی در گیاه نداشته باشد. در صورت ابری بودن هوا علائم بیماری به‌صورت ماتل خفیف مشاهده می‌شود. به‌طورکلی علائم ناشی از این ویروس مخفی و یا بسیار خفیف است. در برخی ارقام چوب‌پنبه‌ای شدن غده در اثر آلودگی به PVX مشاهده شده است. آلودگی هم‌زمان این ویروس با ویروس‌های PVA (*Potato virus A*) و PVY (*Potato virus Y*) باعث ایجاد خسارت بیشتر می‌شود (Beemster, 1987). این ویروس به‌صورت مکانیکی و از طریق غده‌های آلوده انتقال می‌یابد.

ویروس X سیب‌زمینی از جنس *Potexvirus* و خانواده *Alphaflexiviridae* از گروه ویروس‌های رشته‌ای با یک پیکره است. این ویروس اولین بار توسط اسمیت در سال ۱۹۴۱ میلادی توصیف شد. پیکره آن رشته‌ای انعطاف‌پذیر به طول ۵۱۵ و ضخامت ۱۳ نانومتر

است. نود و چهار درصد پیکره را پوشش پروتئینی با وزن مولکولی ۲۵۰۸۰ دالتون تشکیل داده که دارای ۱۲۷۰ زیر واحد (Subunit) است. ژنوم تک‌رشته‌ای مثبت (Positive – sense RNA) با وزن مولکولی $۲/۱×۱۰^۶$ دالتون و تعداد ۶۴۳۵ نوکلئوتید می‌باشد. ساختار انتهایی ′5 آن Cap و ساختار انتهایی ′3 آن PolyA است و حاوی پنج قاب قرائت باز (Open reading frame, ORF) است (Huisman *et al.*, 1988). استفاده از ارقام مقاوم مؤثرترین و آسان‌ترین روش برای کنترل بیماری‌های ویروسی است. با توجه به اهمیت ویروس‌های سیب‌زمینی در زراعت این محصول و میزان خسارتی که وارد می‌کنند، در برنامه‌های به‌نژادی سیب زمینی واکنش کلون‌های پیشرفته نسبت به بیماری‌های مهم ویروسی بررسی می‌شود.

مقاومت به PVX به صورت فوق حساسیت (Hypersensitive Resistance, HR)، مقاومت بسیار بالا (Extreme Resistance, ER)، مقاومت به تجمع ویروس (Resistance to virus accumulation) و مقاومت گیاه بالغ (Mature plant resistance) مشاهده می‌شود (Bonierbale, 2007). مقاومت فوق حساسیت نسبت به PVX در سیب‌زمینی توسط دو ژن غالب *Nx* و *Nb* کنترل می‌شود. سویه های PVX بر اساس توانایی آنها در القاء پاسخ فوق‌حساسیت در ارقام سیب‌زمینی حامل این دو ژن گروه بندی می‌شوند.

ژن *Nb* مقاومت بر علیه گروههای نژادی ۱ و ۲ ایجاد می کند. درحالی که ژن *Nx* مقاومت بر علیه گروههای نژادی ۱ و ۳ را القاء می کند. اما گروه نژادی ۴ به هر دو ژن غلبه می کند. ژن *Nb* روی کروموزوم ۵ در همان ناحیه ژن *Rx2* مکان‌یابی شده است (De Jong *et al.,* 1997). از بین آنها، مقاومت از نوع ER مورد توجه به‌نژادگران سیب زمینی می باشد. دو ژن غالب *Rx1* و *Rx2* در سیب‌زمینی عامل مقاومت ER نسبت به PVX بوده و در محل مایه‌زنی مرگ سلولی و لکه‌های نکروزه قابل مشاهده نیست. عملکرد (Function) این دو ژن یکسان بوده و حضور هر یک از این ژن‌ها حتی در وضعیت ژنتیکی ساده (Simplex, Aaaa) در سیب‌زمینی برای ایجاد مقاومت ER در این گیاه کافی است (Bendahmane *et al.*, 2000).

ژن *Rx1* روی کروموزوم ۱۲و *Rx2* روی کروموزوم ۵ قرار دارد. ژن *Rx1* از زیرگونه وحشی *S. tuberosum* ssp. *andigena* مشتق شده است (Ritter *et al.*, 1991; Bendahmane *et al.*, 1999). ژن *Rx2* از گونه وحشی *S. acaule* مشتق شده است (Bendahmane *et al.*, 1999). نشانگرهای مولکولی به عنوان یک ابزار ژنتیکی قوی برای ردیابی ژن‌های مطلوب در کلکسیون‌های گیاهی در اختیار به‌نژادگران هستند. در حال حاضر از نشانگرهای مولکولی در برنامه های به‌نژادی به عنوان مکمل و سرعت دهنده برنامه های به‌نژادی کلاسیک استفاده می‌شود

(Tuvesson *et al.*, 2007).

در مطالعات قبلی نشانگرهای مولکولی مختلف پیوسته به ژنهای *Rx1* و *Rx2* برای ردیابی هر یک از ژنهای مقاومت ER نسبت به PVX معرفی و برای استفاده در برنامه های بهنژادی سیب زمینی پیشنهاد شدهاند. از این نشانگرها میتوان به CP60 (*Dde*I)، 77L(*Alu*I)، 77R (*Hae*III)، 218 (*Alu*I)، 221R (*Dde*I)، IPM3، IPM4 (*Taq*I) و GP3 (*Taq*I) اشاره کرد که برای ردیابی ژن *Rx1* مورد استفاده قرار می گیرند (Kanyuka *et al.*, 1999).

دو نشانگر پیوسته به ژن *Rx2* شامل GP21 (*Alu*I) و TG432 نیز برای ردیابی ژن *Rx2* معرفی شدهاند (De Jong *et al.*, 1997). هیچ یک از این نشانگرها اختصاصی نیستند، به طوریکه در برخی از ارقام مقاوم قطعه مورد نظر تکثیر نشده و یا برعکس در برخی ارقام حساس باند مرتبط با نشانگر تکثیر میشود. همچنین الگوی هضمی نشانگرهای CAPS با ژنوتیپهای حساس و یا مقاوم همخوانی نداشت. بنابراین قابلیت استفاده از آنها در برنامههای انتخاب به کمک نشانگر (Marker Assisted Selection, MAS) وجود ندارد (Ahmadvand *et al.*, 2013).

مقایسه توالی بین دو ژن *Rx1* و *Rx2* مشخص کرده که این دو ژن ارتباط تکاملی بسیار نزدیکی با هم دارند. این دو ژن در سطح نوکلئوتید ۹۵ درصد و در سطح پروتئین ۹۶ درصد شباهت دارند. شباهت نوکلئوتیدی بالای این دو ژن تفکیک آنها را از یکدیگر مشکل می کند. از طرفی به دلیل ماهیت خاص ژنتیکی سیبزمینی (اتوتتراپلویید و ترازومیک)، پدیده نوترکیبی رایجتر بوده و استفاده از نشانگرهای مولکولی را برای برنامههای انتخاب به کمک نشانگر (MAS) به ویژه در ژنوتیپهای با زمینه ژنتیکی متفاوت، مشکلتر مینماید. احمدوند و همکاران (Ahmadvand *et al.*, 2013) بر اساس توالی ژنهای مقاومت، دو پرایمر اختصاصی شامل 1Rx1 و 5Rx1 برای ژن *Rx1* و یک پرایمر اختصاصی 106Rx2 را برای ژن *Rx2* معرفی کردند که در این تحقیق از دو پرایمر اختصاصی 5Rx1 و 106Rx2 استفاده شد.

در این پژوهش به منظور شناسایی ژنوتیپهای مقاوم در میان برخی ارقام رایج سیبزمینی کشور و کلونهای امیدبخش و همچنین امکان استفاده از آنها در برنامههای بهنژادی ، ابتدا واکنش بیولوژیکی آنها در شرایط گلخانهای به دو روش مایهزنی مکانیکی و پیوند بررسی شد و سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنهای مقاومت به PVX نوع ژن مقاومت (*Rx1* یا *Rx2*) در ژنوتیپهای مقاوم تعیین گردید. نتایج این تحقیق امکان استفاده از ژنوتیپهای حامل این دو ژن به عنوان والد جهت تولید ارقام مقاوم هترودوپلکس (Heteroduplex) به PVX را فراهم می کند.

مواد و روش‌ها

عاری سازی از ویروس و تکثیر ژنوتیپ‌ها

در این پژوهش تعداد ۵۹ ژنوتیپ سیب‌زمینی شامل ۳۵ رقم تجاری و ۲۴ کلون امیدبخشدریافتی از مرکز بین‌المللی سیب‌زمینی (CIP) برای آزمایشات بیولوژیکی و مولکولی غربالگری انتخاب شد (جدول ۱). ابتدا با انجام آزمون الایزا دوطرفه (DAS-ELISA) بر اساس روش کلارک و آدامز (Clark and Adams, 1977) توسط آنتی‌بادی‌های چندهمسانه (Polyclonal) خریداری شده از شرکت Bioreba سوئیس، احتمال آلودگی هر یک از ژنوتیپ‌ها نسبت به هر یک از ویروس‌های PVX، PVY، PLRV، (*Potato virus M*) PVM ،PVA (*Potato leafroll virus*) و (*Potato virus S*) PVS مورد بررسی قرار گرفت. غده‌هایی که نسبت به ویروس‌های مذکور آلودگی نداشتند، جهت تکثیر انتخاب شدند.

جدول۱- ارقام و کلون‌های امیدبخش سیب زمینی مورد بررسی

Table 1. Experimental potato cultivars and promising clones

ردیف No.	رقم Cultivar	ردیف No.	رقم Cultivar	ردیف No.	رقم/کلون Cultivar/Clone	ردیف No.	کلون Clone
1	Oceania	16	Katica	31	Sinora	46	397015-11
2	Marabel	17	Verona	32	Ramos	47	396151-5
3	Caesar	18	Demon	33	Savalan	48	397097-14
4	Markies	19	Bzura	34	Fontane	49	397007-9
5	Opal	20	Florida	35	Picasso	50	397045-7
6	Caruso	21	Hermes	36	Sante	51	396309-7
7	Pamela	22	Jelly	37	397081-1	52	397031-7
8	Lady Rosetta	23	Arinda	38	397082-10	53	397031-16
9	Daifla	24	White Lady	39	396128-32	54	397008-14
10	Emeraude	25	Lorett	40	397074-2	55	397009-8
11	Burren	26	Milva	41	397045-13	56	396140-4
12	Cara	27	Elodie	42	397007-4	57	397045-1
13	Agria	28	Impala	43	397031-1	58	397067-11
14	Desiree	29	Labadia	44	397081-4	59	397031-11
15	Luca	30	Marfona	45	397007-16		

به منظور غربالگری اولیه، ژنوتیپ‌های آلوده به PVX به دلیل حساسیت به ویروس از سایر مراحل تحقیق حذف شدند، اما ژنوتیپ‌های آلوده به سایر ویروس‌ها با استفاده از روش الکتروتراپی عاری از ویروس شدند (Pajouhandeh, 2001). ژنوتیپ‌های انتخابی سالم، به صورت تک‌گره (Single node) روی محیط کشت پایه MS کشت شدند و پس از

رشد کافی در اتاق رشد، به گلخانه منتقل و پس از حدود دو ماه ریزغده‌های تکثیری برداشت شدند.

بررسی واکنش بیولوژیکی ژنوتیپ‌ها نسبت به PVX در شرایط گلخانه‌ای

برای ارزیابی واکنش ارقام و کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی مورد بررسی نسبت به PVX، از روش استاندارد مرکز بین‌المللی سیب‌زمینی (CIP) استفاده شد (Bonierbale, 2007). بر اساس این روش دو آزمایش جداگانه شامل مایه‌زنی مکانیکی و مایه‌زنی پیوند انجام شد.

تهیه زادمایه ویروس PVX

برای تهیه زادمایه ویروس، طی بازدید از مزارع استان اردبیل از بوته‌های مشکوک به آلودگی نمونه‌برداری و آلودگی آن‌ها نسبت به PVX با استفاده از آزمون DAS-ELISA و آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای تایید شد. نمونه‌های آلوده با توجه به حد آلودگی (R) شناسایی شدند و از بین آنها نمونه‌های با غلظت (OD) بیش از دو برای مایه‌زنی انتخاب و عصاره آلوده هر نمونه با استفاده از پودر کربوراندوم ۶۰۰ مش (mesh) روی گیاه محک گل‌تکمه‌ای (*Gompherena globosa*) به‌صورت مکانیکی مایه‌زنی شد و در شرایط گلخانه با دمای بین 25–20 درجه سلسیوس، تناوب نوری ۱۶ ساعت نور و هشت ساعت تاریکی و رطوبت حدود ۷۰ درصد نگهداری شدند.

حدود یک هفته پس از مایه‌زنی، هر یک از لکه‌های موضعی ظاهر شده در سطح برگ را به‌عنوان یک جدایه فرضی ویروسی انتخاب کرده و جهت تکثیر روی توتون (*Nicotiana glutinosa*) به‌صورت مکانیکی مایه‌زنی شدند. یک ماه پس از مایه‌زنی، با استفاده از آزمون سرولوژیکی الایزا آلودگی گیاهان توتون به PVX تایید شد. برای جلوگیری از اختلاط جدایه خالص ویروس روی توتون با سایر جدایه‌ها و یا سایر ویروس‌ها روی گیاهان دیگر در محیط گلخانه، گیاهان آلوده به PVX خالص به صورت تک‌گره روی محیط MS کشت بافت در اتاق رشد تکثیر و نگهداری شدند.

در کلیه آزمون‌های الایزا برای تعیین حد آلودگی، پس از کسر میزان جذب چاهک کنترل (Blank)، میانگین جذب نوری شاهدهای منفی (عصاره گیاه سالم) در طول موج ۴۰۵ نانومتر محاسبه شد و دو برابر آن به‌عنوان حد آلودگی در نظر گرفته شد. نمونه‌هایی که میزان جذب نوری چاهک آن‌ها بیش از حد آلودگی بود به‌عنوان آلوده تلقی شدند.

آزمون‌های بیولوژیکی

مایه زنی مکانیکی: این آزمایش در سه تکرار در شرایط گلخانه با دمای ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس انجام شد. بدین ترتیب که تعداد سه مینی تیوبر از هر رقم/کلون در داخل گلدان‌های حاوی پیت‌موس و پرلیت به نسبت ۲: ۱ کشت شدند. هنگامی که گیاهچه‌ها به مرحله ۴-۲

برگی رسیدند (حدود سه هفته بعد از کشت)، سوسپانسیونی به نسبت وزنی / حجمی ۵٪ از عصاره برگ‌های گیاه توتون آلوده به PVX به عنوان زادمایه توسط هاون چینی در بافر فسفات (pH 7.5; 0.1 M K_2HPO_4, 0.025 M KH_2PO_4) تهیه شد.

برگ‌های گیاهان آزمایشی را توسط پودر کربوراندوم mesh ۶۰۰ غبار پاشی کرده و با مالش دادن ۳-۲ برگچه از هر گیاه توسط پارچه ململ آغشته به سوسپانسیون ویروس، مایه‌زنی انجام شد. برای اطمینان ۴۸ ساعت بعد مایه‌زنی مجدداً تکرار شد. در این آزمایش رقم وایت لیدی (White Lady) به عنوان شاهد مقاوم و رقم هرمس (Hermes) به عنوان شاهد حساس در نظر گرفته شد. حدود ۲۵ روز بعد از مایه‌زنی، آلودگی هر یک از گیاهان با استفاده از تست DAS-ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت و در صورت آلودگی حداقل یکی از تکرارها، به عنوان حساس تلقی شد.

مایه زنی با پیوند: به منظور تعیین نوع مقاومت (ER یا HR)، ساقه ژنوتیپ‌های مقاوم در آزمایش مایه‌زنی مکانیکی به گیاه گوجه فرنگی آلوده به PVX پیوند زده شدند. برای این منظور، تعداد سه گیاهچه از هر رقم/کلون امیدبخش به عنوان پیوندک به طور جداگانه روی گیاهچه‌های گوجه فرنگی رقم حساس روتگرز (Rutgers) آلوده به PVX به عنوان پایه پیوند اسکنه‌ای زده شده و یک ماه بعد ازآلودگی توسط آزمون الایزا مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). ژنوتیپ‌هایی که در هر دو آزمایش مایه‌زنی مکانیکی و پیوند مقاوم بودند، به عنوان ژنوتیپ با مقاومت بسیار بالا (ER) شناسایی شدند و در صورت مشاهده آلودگی در حداقل یک تکرار آزمایشی، نوع مقاومت فوق‌حساسیت (HR) تعیین شد.



شکل ۱- پیوند اسکنه‌ای ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی روی پایه گوجه فرنگی رقم روتگرز آلوده به PVX

Fig. 1. Grafting potato genotypes′ scions on tomato cv. Rutgers rootstocks infected with PVX

ردیابی ژن‌های مقاومت توسط نشانگرهای اختصاصی *Rx1* و *Rx2*:

استخراج دی ان ای (DNA) ژنومی از برگ گیاهان سیب‌زمینی به روش والبوت و وارن (Walbot and Warren, 1988) با اندکی تغییرات شامل موارد زیر انجام شد. در این روش پس از پودر کردن بافت گیاهی در نیتروژن مایع، ۱۰۰ میلی گرم از بافت پودر شده به یک میلی‌لیتر از بافر Lysis (100mM Tris HCL (pH=8)، 50 mM EDTA، 1mM NaCl، 1% PVP) و ۸۰ میکرولیتر SDS 10% قبل از قرار دادن در حمام بن‌ماری با دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. کمیت وکیفیت DNA نمونه‌ها توسط دستگاه نانودراپ Thermo Scientific (مدل ND-1000) و ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. از DNA استخراج شده رقم وایت‌لیدی (White Lady) به عنوان شاهد مقاوم حامل ژن *Rx2* و رقم کارا (Cara) به عنوان شاهد مقاوم حامل ژن *Rx1* استفاده شد. به‌منظور ردیابی ژن‌های مقاومت *Rx1* و *Rx2* به ترتیب از آغازگرهای اختصاصی 5Rx1 و 106Rx2 مبتنی بر توالی هر یک از ژن‌ها استفاده شد که به ترتیب قطعه‌های ۱۸۶ و ۵۴۳ جفت‌بازی را تکثیر می‌نمایند (Ahmadvand *et al.*, 2013). توالی هر یک از این آغازگرها در جدول ۲ آمده است.

جدول۲- آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *Rx1* و *Rx2*

Table 2. Specific primer pairs for *Rx1* and *Rx2* genes

نام آغازگر Primer name	تعداد نوکلئوتید No. nucleotide	ترادف آغازگرها (5´-3´) Sequence (5′-3′)	دمای اتصال Annealing Temperature	طول قطعه تکثیر شده (جفت باز) Size of amplified fragment (bp)
5RX1	20	F :TCAGGGCAAAACCCTAACAC	64	186
5RX1	20	R: ATCGGCCTAGAGTGACATCG		
106 RX2	21	F: GGAGAAATCCTGCAATGTAAC	66	543
106 RX2	21	R: CTTGTCAAAGAAAGAAGGCCT		

F: آغازگر مستقیم، R: آغازگر معکوس، bp: جفت باز

F: Forward primer, R: Reverse primer, bp: Base pairs

اجزای مخلوط واکنش PCR (Master Mix) با حجم نهایی ۲۴ میکرولیتر شامل سه میکرولیتر از DNA(۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر)، ۲/۴ میکرولیتر ازهر یک از آغازگرها (پنج میکرومول)، سه میکرولیتربافرPCR 10X محتوی کلرید منیزیوم، ۲/۴ میکرولیترمخلوط نوکلئوتیدی (dNTP) (۱۰ میلی‌مولار)، دو میکرولیتر آنزیم یک واحد *Taq* DNA Polymerase (شرکت سیناژن) و ۸/۸ میکرولیتر آب خالص بود.

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از دستگاه ترموسایکلر Biometra (مدل T-Gradient Thermoblock) استفاده شد که با چرخه حرارتی زیر برای تکثیر قطعات مورد نظر روی دستگاه تنظیم شد: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه و تعداد ۳۵ چرخه با واسرشت

سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها بر اساس جدول ۲ به مدت ۲۰ ثانیه، بسط زنجیره در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و بسط نهایی زنجیره در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام شد. محصول نهایی حاصل از PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر 1X BE با استفاده از الکتروفورز تفکیک و اندازه تقریبی قطعه تکثیر شده با استفاده از نشانگر DNA ۱۰۰ جفت بازی (100bp) تعیین شد.

نتایج و بحث

خالص سازی و تکثیر ویروس

نتایج آزمون DAS-ELISA روی نمونه‌های جمع آوری شده از استان اردبیل نشان داد که میزان جذب نوری تعداد ۱۰ نمونه آلوده به PVX در طول موج ۴۰۵ نانومتر بیش از ۲ (OD>2) بود. یک هفته پس از مایه‌زنی عصاره این نمونه‌ها روی گیاه محک گل تکمه‌ای (*G. globosa*) علائم لکه موضعی روی برگ‌های آن ظاهر شد(شکل ۲). هر یک از لکه های موضعی به‌عنوان یک جدایه خالص فرضی ویروسی انتخاب و روی یک گیاهچه توتون مایه‌زنی شد. پس از ظهور علائم و تایید آلودگی با تست الایزا، از آن‌ها نمونه کشت بافت تهیه شد. از بین این نمونه‌ها، جدایه خالص X6 با میزان جذب سه برای انجام آزمایشات مایه‌زنی انتخاب شد.



تصویر۲ – علائم لکه موضعی ناشی از PVX روی گیاه محک گل تکمه‌ای

Fig. 2. Local lesion symptoms on test plant *Gompherena globosa* inoculated with PVX

در یک مطالعه برخی از جدایه‌های مورد بررسی در استان همدان بر اساس

تـوالی پوشـش پروتئینـی گـروه بنـدی شـد (Shokrollahi *et al.,* 2013). در مطالعـه دیگـری نمونـه‌هـای جمـع آوری شـده از نـه اسـتان بـر اسـاس نـوع علائـم روی گیـاه توتـون گونه *N. glutinosa* بـه دو گـروه تقسیم شـدند (Massumi *et al.,* 2014). نمونه مـورد بررسـی در ایـن تحقیـق روی توتـون علائـم مـوزائیکی خفیف ایجاد کرد کـه بـه جدایـه هـای گـروه دو این تحقیق شباهت دارد.

نتایج ارزیابی بیولوژیکی ژنوتیپ‌ها نسبت به PVX در شرایط گلخانه‌ای

نتایج مایه‌زنی مکانیکی:

سه هفته پس از مایـه‌زنـی مکـانیکی هـر یـک از تکرارهـا، نتـایج حاصـل از آزمـون الایـزا در طـول مـوج ۴۰۵ نـانومتر نشـان داد کـه تعـداد ۳۳ ژنوتیـپ شـامل ۱۲ کلـون امیـدبخش و ۲۱ رقـم تجـاری سیب‌زمینـی در هیچ‌یـک از تکرارهـای آزمایشـی آلـودگی نداشـتند. بنـابراین بـه عنوان ژنوتیپ های مقـاوم در نظـر گرفتـه شـدند و برای تعیین نوع مقاومت در آزمـایش مایـه‌زنـی پیونـد مـورد اسـتفاده قـرار گرفتنـد. همچنـین میزان جذب ۲۶ ژنوتیپ شـامل ۱۴ رقـم تجـاری و ۱۲ کلـون امیـدبخش در طـول مـوج ۴۰۵ نـانومتر بـیش‌از حـد آلـودگی بـود و بـه عنـوان ژنوتیـپ هـای حسـاس بـه PVX تلقـی شـدند (جدول ۳).

نتایج مایه‌زنی پیوند

واکـنش ژنوتیـپ‌هـای پیونـد شـده روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم روتگرز آلـوده بـه PVX نیز توسط آزمون الایزا مورد بررسـی قـرار گرفت. نتایج نشـان داد کـه ۱۲ رقـم و ۱۱ کلـون امیدبخش فاقد آلودگی بودند. این ژنوتیپ‌ها کـه در هـر دو آزمـایش مکـانیکی و پیونـد فاقـد آلودگی بودند به عنوان ژنوتیپ‌های بـا مقاومـت از نوع بسیار بالا (ER) در نظر گرفته شدند. سـایر ژنوتیـپ‌هـای مقـاوم در آزمـایش مایـه‌زنـی مکـانیکی شـامل نـه رقـم تجـاری و یـک کلـون امیدبخش پس از پیوند روی گوجه‌فرنگی آلـوده به ویروس واکنش حساسیت بروز دادند. بنابراین به عنوان ژنوتیپ‌های با مقاومـت فـوق حساسـیت (HR) شناسـایی شـدند (جـدول ۴). ایـن ۱۰ ژنوتیپ بـا مقاومـت فـوق‌حساسـیت در آزمـایش مایـه زنـی مکـانیکی در محـل مایـه‌زنـی علائـم نکروز موضعی بروز داده بودند که احتمالاً نشـان دهنـده وجـود ژن *Nb* یـا *Nx* در ایـن ژنوتیـپ‌هـا است (Bonierbale, 2007; Cockerham, 1970). نتایج حاصـل از آزمایشـات مایـه‌زنـی مکـانیکی و پیوند نشان داد که ۴۴ درصد ژنوتیپ‌هـا نسـبت بـه PVX حسـاس بـوده و ۳۹ درصـد ژنوتیـپ‌هـا بـا مقاومت ER و تنها ۱۷ درصد آنها دارای مقاومـت از نوع HR بودند. رقم تجاری اگریـا، کـه حـدود ۲۵ درصـد سـطح زیرکشـت سـیب‌زمینـی را در کشـور بـه خـود اختصـاص داده اسـت (مکاتبـات شخصـی بـا دفتـر سـبزی و صـیفی، وزارت جهـاد کشـاورزی)، دارای مقاومـت از نـوع بسـیار بـالا (ER) بود. اما رقم مارفونا به عنوان یک رقـم نسـبتاً زودرس کـه سـال‌هـای متمـادی در سـطح نسـبتاً وسیعی کشت می‌شد دارای مقاومت HR بود.

جدول ۳- واکنش ارقام و کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی به PVX در آزمایش مایه‌زنی مکانیکی

Table3. Reaction of potato cultivars and promising clones to PVX in mechanical inoculation assay

ردیف No.	رقم Cultivar	تکرار ۱ Rep. 1	تکرار ۲ Rep. 2	تکرار۳ Rep. 3	واکنش Reaction	ردیف No.	رقم/کلون Cultivar/Clone	تکرار ۱ Rep. 1	تکرار ۲ Rep. 2	تکرار۳ Rep. 3	واکنش Reaction	ردیف No.	کلون Clone	تکرار ۱ Rep. 1	تکرار ۲ Rep. 2	تکرار۳ Rep. 3	واکنش Reaction
1	Oceania	R	R	R	R	21	Hermes*	S	S	S	S	41	397045-13	R	R	S	S
2	Marabel	R	R	R	R	22	Jelly	S	S	R	S	42	397007-4	R	S	S	S
3	Caesar	S	S	R	S	23	Arinda	R	S	S	S	43	397031-1	R	S	S	S
4	Markies	R	R	R	R	24	White Lady*	R	R	R	R	44	397081-4	R	R	R	R
5	Opal	R	R	R	R	25	Lorett	R	R	R	R	45	397007-16	S	S	S	S
6	Caruso	S	S	R	S	26	Milva	R	R	R	R	46	397015-11	R	R	R	R
7	Pamela	S	S	R	S	27	Elodie	R	R	R	R	47	396151-5	R	R	R	R
8	Lady Rosetta	R	R	R	R	28	Impala	S	S	S	S	48	397097-14	R	R	R	R
9	Daifla	S	R	S	S	29	Labadia	R	R	R	R	49	397007-9	S	S	S	S
10	Emeraude	S	S	S	S	30	Marfona	R	R	R	R	50	397045-7	R	R	R	R
11	Burren	R	R	R	R	31	Sinora	R	R	R	R	51	396309-7	R	R	R	R
12	Cara*	R	R	R	R	32	Ramos	R	R	R	R	52	397031-7	R	R	S	S
13	Agria	R	R	R	R	33	Savalan	S	S	S	S	53	397031-16	S	S	R	S
14	Desiree	S	S	S	S	34	Fontane	R	R	R	R	54	397008-14	R	S	R	S
15	Luca	R	R	R	R	35	Picasso	R	R	R	R	55	397009-8	S	S	S	S
16	Katica	S	S	S	S	36	TP22-1	R	S	S	S	56	396140-4	R	R	R	R
17	Verona	R	R	R	R	37	397081-1	R	S	S	S	57	397045-1	R	R	R	R
18	Demon	S	S	S	S	38	397082-10	R	R	R	R	58	397067-11	R	R	R	R
19	Bzura	R	R	R	R	39	396128-32	R	R	R	R	59	397031-11	R	R	R	R
20	Florida	S	S	S	S	40	397074-2	S	S	S	S						

R: Resistant, S: Susceptible, ∗: Resistant control,∗∗: Susceptible control, Rep.: Replication

R: مقاوم، S: حساس، *: شاهد مقاوم، **: شاهد حساس.

جدول ۴- واکنش ارقام و کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی نسبت به PVX در آزمایش مایه‌زنی پیوند

Table 4. Reaction of potato cultivars and promising clones to PVX in grafting inoculation assay

ردیف No.	رقم Cultivar	تکرار ۱ Rep. 1	تکرار ۲ Rep. 2	تکرار۳ Rep. 3	واکنش Reaction	ردیف No.	رقم / کلون Cultivar/ Clone	تکرار ۱ Rep. 1	تکرار ۲ Rep. 2	تکرار۳ Rep. 3	واکنش Reaction
1	Oceania	S	S	S	HR	18	Sinora	S	S	S	HR
2	Marabel	R	R	R	ER	19	Ramos	S	S	S	HR
3	Markies	S	S	S	HR	20	Fontane	R	R	R	ER
4	Opal	R	R	R	ER	21	Picasso	S	S	S	HR
5	Lady Rosetta	R	R	R	ER	22	397082-10	R	R	R	ER
6	Burren	S	S	S	HR	23	396128-32	R	R	R	ER
7	Cara	R	R	R	ER	24	397081-4	R	R	R	ER
8	Agria	R	R	R	ER	25	397015-11	R	R	R	ER
9	Luca	R	R	R	ER	26	396151-5	R	R	R	ER
10	Verona	S	S	S	HR	27	397097-14	R	R	R	ER
11	Bzura	R	R	R	ER	28	397045-7	S	S	S	HR
12	White Lady	R	R	R	ER	29	396309-7	R	R	R	ER
13	Lorett	R	R	R	ER	30	396140-4	R	R	R	ER
14	Milva	S	S	S	HR	31	397045-1	R	R	R	ER
15	Elodie	R	R	R	ER	32	397067-11	R	R	R	ER
16	Labadia	R	R	R	ER	33	397031-11	R	R	R	ER
17	Marfona	S	S	S	HR						

HR: واکنش مقاومت فوق حساسیت، ER: واکنش مقاومت بسیار بالا، R: مقاوم، S: حساس.

HR: Hypersensitive Resistance, ER: Extreme Resistance, R: Resistant, S: Susceptible, Rep.: Replication.

در مقابل رقم جلی (Jelly) با سطح زیر کشت زیاد در بسیاری از مناطق، نسبت به PVX حساسیت نشان داد که لازم است در برنامه تولید بذر این رقم مراقبت‌های لازم برای پیشگیری از گسترش آلودگی صورت گیرد. از بین کلون‌های امیدبخش، ۵۰ درصد آنها نسبت به این ویروس حساس بودند. آزمایشات قبلی روی گروه دیگری از کلون‌های امیدبخش دریافتی از مرکز بین‌المللی سیب‌زمینی (CIP) نیز نشان داد که بسیاری از آنها نسبت به PVX حساس بودند (احمدوند، منتشر نشده).

در برخی از منابع مقاومت ER به دلیل ایجاد سطح بالایی از مقاومت به عنوان پاسخ مصونیت (Immune response) در نظر گرفته می شود. به‌طوریکه گیاه حتی تحت فشار اینوکولوم زیاد ویروس آلوده نمی‌شود و گیاه را به عنوان غیر میزبان (Non-host) برای ویروس در نظر می‌گیرند. بنابراین در سیب‌زمینی مقاومت ER مورد توجه به‌نژادگران است، زیرا این نوع مقاومت نسبت به همه نژادهای ویروس مقاوم است و همچنین بر خلاف مقاومت از نوع فوق حساسیت، تحت تاثیر شرایط محیطی و فیزیولوژی گیاه قرار نمی‌گیرد.

در مجموع از ۵۹ ژنوتیپ مورد بررسی در این تحقیق، ۳۳ ژنوتیپ شامل ۱۲ رقم و ۱۱ کلون امیدبخش دارای مقاومت ER بودند که می‌توان از آنها در برنامه‌های به‌نژادی به عنوان منبع مقاومت استفاده کرد. در مقابل تنها ۱۰ ژنوتیپ شامل نه رقم و یک کلون امیدبخش دارای مقاومت HR بودند. در سیب زمینی واکنش فوق حساسیت نسبت به PVX به صورت سوش اختصاصی (Strain-specific) می باشد و ژن‌های این نوع مقاومت تنها نسبت به یک سوش خاص از ویروس مقاومت نشان داده و روی سایر سوش‌ها مؤثر نیستند (فرضیه ژن برای ژن) و همچنین تحت تاثیر دما و شرایط فیزیولوژیکی گیاه قرار می‌گیرد. بنابراین یک مقاومت پایدار نیست (Jones, 1990; Loebenstein and Carr, 2006).

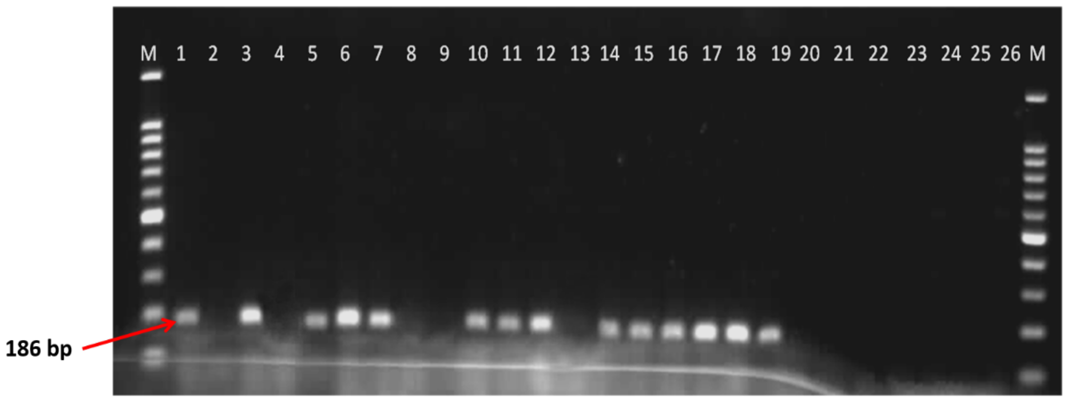
ژن‌های مقاومت تک ژنی HR نسبت به PVX در بسیاری از ارقام سیب‌زمینی گزارش شده است که مقاومت مزرعه‌ای نسبت به این ویروس ایجاد می‌کنند. مقاومت فوق حساسیت نسبت به PVX در سیب‌زمینی توسط دو ژن غالب *Nx* و *Nb* کنترل می‌شود (Cockerham, 1970). در کاتالوگ بسیاری از ارقام وارداتی سیب‌زمینی در کشور واکنش به PVX را به صورت مقاومت "نسبتاً زیاد" و یا "خیلی زیاد" ارائه می دهند که نوع مقاومت ER یا HR را از هم تفکیک نکرده است، بنابراین احتمال آلودگی این ارقام به PVX وجود دارد.

نتایج غربالگری ژنوتیپ‌ها برای ژن‌های *Rx1* و *Rx2* با استفاده از نشانگرهای مولکولی

غربالگری ژنوتیپ‌ها برای ژن *Rx1*

به منظور تکثیر بخشی از ژن‌های مقاومت *Rx1* توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از جفت آغازگر 5RX1 استفاده شد. آغازگر 5RX1 در

رقم کارا (Cara) (شاهد حامل ژن *Rx1*) و ۱۳ ژنوتیپ شامل شش رقم تجاری و هفت کلون امیدبخش مقاوم قطعه‌ای از DNA با اندازه ۱۸۶ جفت‌باز تکثیر نمود. اما این قطعه در رقم بزورا (Bzura) (شاهد حامل ژن *Rx2*) و همچنین ارقام حساس در آزمایش بیولوژیکی تکثیر نشد (شکل ۳). بنابراین ارقامی که این قطعه در آنها تکثیر نشد حامل ژن *Rx2* و یا نسبت به این ویروس حساس هستند. مقایسه نتایج مولکولی با نتایج آزمونهای بیولوژیکی (مایه زنی مکانیکی و پیوند) نشان داد که ۱۳ ژنوتیپی که باند مورد نظر در آنها تکثیر شده، مقاومت ER داشته و این قطعه در هیچکدام از ژنوتیپ‌های حساس تکثیر نشد که حاکی از توانایی نشانگر مولکولی 5RX1 برای تفکیک دقیق ژنوتیپ‌های حساس از ژنوتیپ‌های مقاوم حامل ژن *Rx1* است.



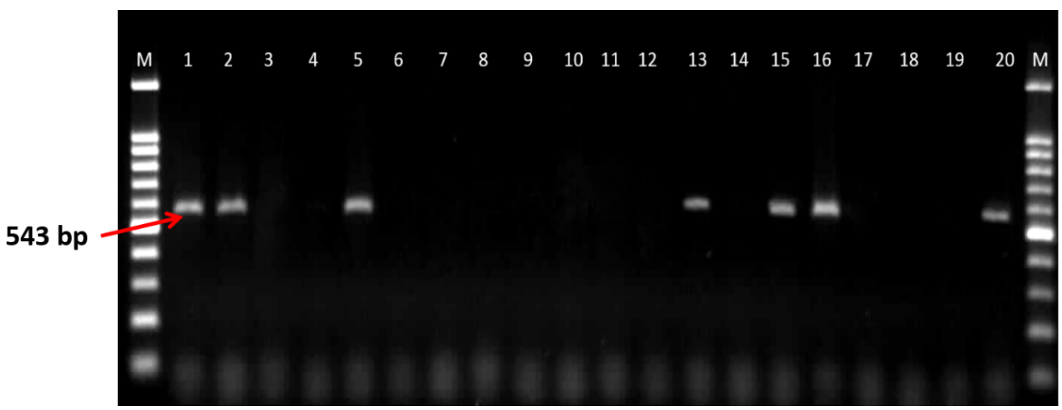
شکل ۳- الگوی الکتروفورز ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی مورد آزمایش با استفاده از جفت آغازگر 5RX1 (نشانگر اختصاصی ژن *Rx1*).

M: Lader (100bp)؛ شماره ۱ تا ۲۶ به ترتیب از چپ به راست بیانگر، ۱: Cara ۲: Bzura ۳: Labadia ۴: Pamella ۵: 396128-32 ۶: Lady Rossetta ۷: 396309-7 ۸: Hermes ۹: 397031-1 ۱۰: Marabel ۱۱: Agria ۱۲: Fontane ۱۳: TP22-1 z ۱۴: 397031-11 ۱۵: 397082-10 ۱۶: 397067-11 ۱۷: 396151-5 ۱۸: 397081-4 ۱۹: Opal ۲۰: White Lady ۲۱: Luca ۲۲: Sinora ۲۳: 397015-11 ۲۴: Emrad ۲۵: Burren ۲۶: Daifla هستند.

Fig. 3. Electrophoresis pattern of examined potato genotypes (1 to 26) using primer pairs, 5RX1 (*Rx1*-marker specific); Samples from left to right: M: Lader (100bp), 1: Cara, 2: Bzura, 3: Labadia, 4: Pamella, 5: 396128-32, 6: Lady Rossetta, 7: 396309-7, 8: Hermes, 9: 397031-1, 10: Marabel, 11: Agria, 12: Fontane, 13: TP22-1, 14: 397031-11, 15: 397082-10, 16: 397067-11, 17: 396151-5, 18: 397081-4, 19: Opal, 20: White Lady, 21: Luca, 22: Sinora, 23: 397015-11, 24: Emrad, 25: Burren, 26: Daifla

نتایج غربالگری ژنوتیپ‌ها برای ژن *Rx2*

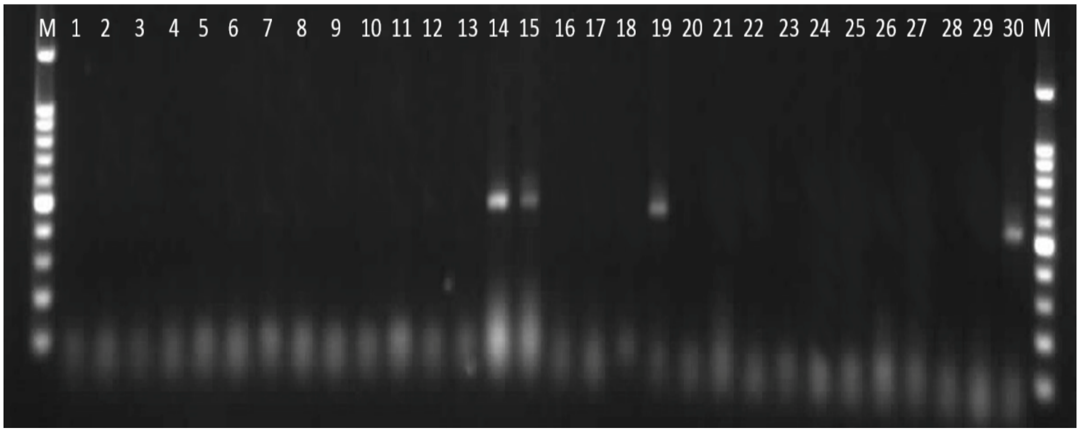
آغازگر اختصاصی 106RX2 در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطعه‌ای به طول ۵۴۳ جفت‌باز از ژن *Rx2* در رقم وایت‌لیدی(White Lady) (حامل ژن *Rx2*) و نه ژنوتیپ با مقاومت ER در آزمایشات بیولوژیکی شامل چهار رقم تجاری و چهار کلون امیدبخش تکثیر نمود. اما این آغازگر قادر به تکثیر این قطعه در رقم کارا (Cara) (حامل ژن *Rx1*) و ژنوتیپ‌های حساس نبود (شکل ۴ و ۵). مقایسه نتایج غربالگری مولکولی توسط نشانگر 106RX2 با غربالگری بیولوژیکی (مایه زنی مکانیکی و پیوند) نشان داد که نتایج بیولوژیکی و مولکولی با همدیگر تطابق کاملی دارد و این نشانگر برای غربالگری ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی برای ژن *Rx2* قابل اعتماد می‌باشد. نتایج مطالعات دیگر نیز نشان داده که دو نشانگر 5Rx1 و 106Rx2 برای ردیابی به ترتیب ژن‌های مقاومت *Rx1* و *Rx2* کارایی لازم را دارند (Ozkaynak *et al.*, 2018; Shaikhaldein *et al.*, 2018).



شکل ۴- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در نمونه‌های سیب‌زمینی با استفاده از جفت آغازگر 106RX (نشانگر اختصاصی ژن *Rx2*).

M: مارکر (100bp)، شماره ۱ تا ۲۰ به ترتیب از چپ به راست بیانگر، ۱: Bzura ،۲: White Lady، ۳: Cara ،۴: Agria ،۵: 396140-4 ،۶: Sinora ،۷: Burren ،۸: Oceania ،۹: Marfona ،۱۰: Markis ،۱۱: Caesar ،۱۲: Picaso ،۱۳: Luca ،۱۴: Ramos ،۱۵: Lorett ،۱۶: Elodie ،۱۷: Marabel ،۱۸: 396128-32 ،۱۹: 397031-7 ،۲۰: 397097-14 هستند.

Fig. 4. Electrophoresis pattern of examined potato genotypes (1 to 20) using primer pairs, 106Rx2 (*Rx2*-marker specific); Samples from left to right: M: Lader (100bp), 1: Bzura, 2: White Lady, 3: Cara, 4: Agria, 5: 396140-4, 6: Sinora, 7: Burren, 8: Oceania, 9: Marfona, 10: Markiz, 11: Caesar, 12: Picaso, 13: Luca, 14: Ramos, 15: Lorett, 16: Elodie, 17: Marabel, 18: 396128-32, 19: 397031-7, 20: 397097-14



تصویر ۵- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در نمونه‌های سیب‌زمینی با استفاده از آغازگر 106RX (نشانگر اختصاصی ژن *Rx2*).

شماره ۱ تا ۳۰ به ترتیب از چپ به راست بیانگر M مارکر (100 bp) ۱: 397031-11 ۲: 397007-9 ۳: 397082-10 ۴: 397081-1 ۵: 397031-1 ۶: 396151-5 ۷: 397074-2 ۸: 397081-4 ۹: 396309-7 ۱۰: 397009-8 ۱۱: 397067-11 ۱۲: 397045-7 ۱۳: 397045-13 ۱۴: Bzura ۱۵: 396140-4 ۱۶: 397008-14 ۱۷: 397007-4 ۱۸: 397007-16 ۱۹: 397045-1 ۲۰: Emrad ۲۱: Arinda ۲۲: Opal ۲۳: Labadia ۲۴: Hermes ۲۵: Difella ۲۶: Lady Rosseta ۲۷: Impala ۲۸: Cara ۲۹: Katica ۳۰: 397015-11 می‌باشند.

Fig. 5. Electrophoresis pattern of examined potato genotypes using primer pairs, 106Rx2 (*Rx2*-marker specific); Samples from left to right: M: Lader (100bp), 1: 397031-11, 2: 397007-9, 3: 397082-10, 4: 397081-1, **5:** 397031-1, 6: 396151-5, **7:** 397074-2, 8: 397081-4, 9: 396309-7, 10: 397009-8, 11: 397067-11, 12: 397045-7, 13: 397045-13, 14: Bzura, 15: 396140-4, 16: 397008-14, 17: 397007-4, 18: 397007-16, 19: 397045-1, 20: Emrad, 21: Arinda, 22: Opal, 23: Labadia, 24: Hermes, 25: Difella, 26: Laddy Rosseta, 27: Impala, 28: Cara, 29: Katica, 30: 397015-11

مقایسه نتایج آزمایشات بیولوژیکی و مولکولی نشان داد که با یکدیگر مطابقت دارند به‌طوری که ژنوتیپ‌هایی که در آزمایشات گلخانه‌ای به عنوان مقاوم از نوع ER ارزیابی و شناسایی شدند، با آزمایشات مولکولی مشخص شد که دارای یکی از دو ژن *Rx1* و یا *Rx2* بودند. در مقابل در هیچ‌کدام از ژنوتیپ‌هایی که در آزمایشات بیولوژیکی حساس ارزیابی و شناسایی شدند، نشانگر اختصاصی مرتبط با این ژن‌ها تکثیر نشد (جدول ۵).

جدول ۵- واکنش بیولوژیکی ارقام و کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی به PVX و مقایسه آن با نتایج نشانگرهای مولکولی

Table 5. Biological reaction of potato cultivars and promising clones to PVX in comparison with results of molecular markers

ردیف No.	رقم Cultivar	واکنش بیولوژیکی Biological Reaction	*Rx1*	*Rx2*	ردیف No.	رقم /کلون Cultivar/Clone	واکنش بیولوژیکی Biological Reaction	*Rx1*	*Rx2*	ردیف No.	کلون Clone	واکنش بیولوژیکی Biological Reaction	*Rx1*	*Rx2*
1	Oceania	HR	–	–	21	Hermes	S	–	–	41	397045-13	S	–	–
2	Marabel	ER	+	–	22	Jelly	S	–	–	42	397007-4	S	–	–
3	Caesar	S	–	–	23	Arinda	S	–	–	43	397031-1	S	–	–
4	Markies	HR	–	–	24	White Lady	ER	–	+	44	397081-4	ER	+	–
5	Opal	ER	+	–	25	Lorett	ER	–	+	45	397007-16	S	–	–
6	Caruso	S	–	–	26	Milva	HR	–	–	46	397015-11	ER	–	+
7	Pamela	S	–	–	27	Elodie	ER	–	+	47	396151-5	ER	+	–
8	Lady Rosetta	ER	+	–	28	Impala	S	–	–	48	397097-14	ER	–	+
9	Daifla	S	–	–	29	Labadia	ER	+	–	49	397007-9	S	–	–
10	Emeraude	S	–	–	30	Marfona	HR	–	–	50	397045-7	HR	–	–
11	Burren	HR	–	–	31	Sinora	HR	–	–	51	396309-7	ER	+	–
12	Cara	ER	+	–	32	Ramos	HR	–	–	52	397031-7	S	–	–
13	Agria	ER	+	–	33	Savalan	S	–	–	53	397031-16	S	–	–
14	Desiree	S	–	–	34	Fontane	ER	+	–	54	397008-14	S	–	–
15	Luca	ER	–	+	35	Picasso	HR	–	–	55	397009-8	S	–	–
16	Katica	S	–	–	36	TP22-1	S	–	–	56	396140-4	ER	–	+
17	Verona	HR	–	–	37	397081-1	S	–	–	57	397045-1	ER	–	+
18	Demon	S	–	–	38	397082-10	ER	+	–	58	397067-11	ER	+	–
19	Bzura	ER	–	+	39	396128-32	ER	+	–	59	397031-11	ER	+	–
20	Florida	S	–	–	40	397074-2	S	–	–					

HR: واکنش مقاومت فوق حساسیت، ER: واکنش مقاومت بسیار بالا، R: مقاوم، S: حساس.

HR: Hypersensitive Resistance, ER: Extreme Resistance, R: Resistant, S: Susceptible

سپاسگزاری

داده های مورد استفاده در این مقاله از پروژه تحقیقات شماره ۲-۰۳-۰۳-۹۳۱۶۱ مصوب موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر بود. نگارندگان بدینوسیله از مدیریت آن موسسه که امکانات لازم برای اجرای بهینه این پروژه تحقیقاتی را فراهم آوردند سپاسگزاری می کنند. از آقای مهندس علی نصراللهی که در کلیه مراحل اجرای این پروژه تحقیقاتی کمال همکاری را داشتند نیز تشکر می نمایند.

References

Ahmadvand, R., Wolf, I., Gorji, A. M., Polgár, Z., and Taller, J. 2013. Development of molecular tools for distinguishing between the highly similar *Rx1* and *Rx2* PVX extreme resistance genes in tetraploid potato. Potato Research 56: 277-291.

Anonymous, 2019. Statistical Year Book of Agricultural Crops. 1st Volume: Filed Crops. Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran. 97 pp. (in Persian).

Beemster, A. B. R. 1987 .Virus translocation and mature-plant resistance in potato plants. pp. 116-125. In: de Bokx, J. A., and van der Want, J. P. H (eds.). Viruses of potatoes and seed potato production. Pudoc, Wageningen, The Netherlands.

Bendahmane, A., Baulcombe, D. C., and Kanyuka, K. 1999. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. Plant Cell 11: 781-791.

Bendahmane, A., Querci, M., kanyuka, K., and Baulcombe, D. C. 2000. Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. Plant Journal 21: 73-81.

Bonierbale, M. 2007. Procedures for standard evaluation trials of advanced potato clones. An International cooperator's guide. International Potato Center, Peru. 126 pp.

Clark, M. F., and Adams, A. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475-483.

Cockerham, G. 1970. Genetical studies on resistance to *Potato viruses X* and Y. Heredity 25: 309-348.

de Bokx, J.A., Beemster, R. H. R., Lambers, H. J., van Hoof, H. A., Maat, D. Z., Reestman, A. J., Rozendaal, A., Schepers, A., and van Slogteren, D. H. M. 1972. Viruses of potatoes and seed-potato production. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen, The Netherlands. 237 pp.

De Jong, W., Forsyth, A., Leister, D., Gebhardt, C., and Baulcombe, D. C. 1997. A

potato hypersensitive resistance gene against *Potato virus X* maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. Theoretical and Applied Genetics 95: 246-252.

Ezekiel, R., Singh, N., Sharma, S., and Kaur, A. 2013. Beneficial phytochemicals in potato-a review. Food Research International 50: 487-496.

Huisman, M. J., Linthorst, H. J. M., Bol, J. F., and Cornelissen, J. C. 1988. The complete nucleotide sequence of *Potato virus X* and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. Journal of General Virology 69: 1789-1798.

Jones, R. A. C. 1990. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. Annals of Applied Biology 117: 93-105.

Kanyuka, K. B. A., Bendahmane, A., van der Voort, J. N. A. M. R., and van der Vossen, E. A. G. 1999. Mapping of intra locus duplications and introgressed DNA: aids to map-based cloning of genes from complex genomes illustrated by physical analysis of the *Rx* locus in tetraploid potato. Theoretical and Applied Genetics 98: 679-689.

Loebenstein, G., and Carr, J. P. 2006. Natural resistance mechanisms of plants to viruses. Springer. The Netherlands. 547 pp.

Massumi, H., Poormohammadi, S., Pishyar, S., Maddahian, M., Heydarnejad, J., Hosseini-Pour, A., van Bysterveldt, K., and Varsani, A. 2014. Molecular characterization and field survey of Iranian *Potato virus X* isolates. Virus Disease 25: 338-344.

Ozkaynak, E., Devran, Z., and Kaheci, E. 2018. Development of Turkish potato varieties tolerance to *Potato virus Y* and *Potato virus X*. Ekin. Journal of Crop Breeding and Genetics 4: 55-59.

Pajouhandeh, M. 2001. Creation of *in vitro* virus free potato germplasm bank. M. Sc. Thesis. Tarbiat Modares University. Tehran, Iran. 185 pp.

Ritter, E., Debener, T., Barone, A., Salamini, F., and Gebhardt, C. 1991. RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to *Potato virus X* (PVX). Molecular and General Genetics 227: 81-85.

Scholthof, K. B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., and Ahlquist, P. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 12: 938-954.

Shaikhaldein, H. O., Hoffmann, B., Alaraidh, I. A., and Aseel, D .G. 2018. Evaluation of extreme resistance genes of *Potato virus X* (*Rx1* and *Rx2*) in different

potato genotypes. Journal of Plant Diseases and Protection 125: 251-257.

Shokrollahi, N., Pourrahim, R., Farzadfar, Sh., and Nazari, S. 2012. Biological and molecular characterization of two *Potato virus X*- isolates from Hamedan province. Applied Entomology and Phytopathology 80: 119-130 (in Persian).

Tuvesson, S., Dayteg, C., Hagberg, P., Manninen, O., Tanhuanpää, P., Tenhola-Roininen, T,. Kiviharju, E., Weyen, J., Förster, J., and Schondelmaier, J. 2007. Molecular markers and doubled haploids in European plant breeding programmes. Euphytica 158: 305-312.

Walbot, V., and Warren, C. 1988. Regulation of *Mu* element copy number in maize lines with an active or inactive Mutator transposable element system. Molecular and General Genetics 211: 27-34.